

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭58—157723

⑫ Int. Cl. ³ A 61 K 37/04 37/00 // A 61 K 35/12 35/14 35/28 35/84	識別記号 7138—4C 7138—4C 7138—4C 7138—4C 7138—4C 7138—4C	府内整理番号 7138—4C 7138—4C 7138—4C 7138—4C 7138—4C 7138—4C	⑬ 公開 昭和58年(1983)9月19日 発明の数 1 審査請求 未請求
			(全18頁)

⑭ インターロイキン 2 を含有してなる免疫療法

剤

⑮ 特 願 昭57—40369

⑯ 出 願 昭57(1982)3月15日

⑰ 発明者 吉元良太
川崎市幸区鹿島田958

⑱ 発明者 鹿島信一

横浜市旭区若葉台2—21—603

⑲ 発明者 羽室淳爾

横浜市戸塚区深谷町241—32

⑲ 発明者 光木浩司

横浜市旭区中沢町80—170

⑳ 出願人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8号

明細書

1 発明の名称

インターロイキン 2 を含有してなる免疫療法剤

2 特許請求の範囲

- (1) ヒト細胞由来のヒトイントロイキン 2 を含有してなる免疫疾患治療予防剤。
- (2) ヒト細胞がヒトリンパ球、同クローン化細胞またはハイブリドーマである特許請求の範囲第1項記載の薬剤。
- (3) ヒトイントロイキン 2 の比活性が 2×10^5 unit/mg蛋白であり、他のヒトリンパカイン、モノカイン活性を含有しないものである特許請求の範囲第1項記載の薬剤。
- (4) 免疫疾患が癌、細菌感染、ウイルス性疾患、免疫不全症または自己免疫疾患であるところの特許請求の範囲第1項記載の薬剤。
- (5) ヒトイントロイキン 2 を含有してなる薬剤がヒトイントロイキン 2 と免疫原としての抗原を含有してなる薬剤もしくはヒトイントロイキン 2 を含有する第1剤と抗原を含有する第2剤よりなる薬剤ヤットとして構成される特許請求の範囲第1項記載の薬剤。
- (6) 免疫原としての抗原が腫瘍抗原、細菌抗原またはウイルス抗原であるところの特許請求の範囲第6項記載の薬剤。

しくは／および他の免疫療法剤を含有してなる薬剤もしくはヒトイントロイキン 2 を含有する第一剤と化学療法剤もしくは／および他の免疫療法剤を含有する第2剤よりなる薬剤ヤットとして構成される特許請求の範囲第1項記載の薬剤。

(6) 其の免疫療法剤がインターフェロンもしくは免疫活性多糖である特許請求の範囲第6項記載の薬剤。

(7) 免疫活性多糖がレンチナンである特許請求の範囲第6項記載の薬剤。

(8) ヒトイントロイキン 2 を含有してなる薬剤がヒトイントロイキン 2 と免疫原としての抗原を含有してなる薬剤もしくはヒトイントロイキン 2 を含有する第1剤と抗原を含有する第2剤よりなる薬剤ヤットとして構成される特許請求の範囲第1項記載の薬剤。

(9) 免疫原としての抗原が腫瘍抗原、細菌抗原またはウイルス抗原であるところの特許請求の範囲第6項記載の薬剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明はヒトインターロイキン2（以下、「インターロイキン2」を「IL-2」と略記することがある。）を含有してなる免疫療法剤、更に詳しくはヒトリンパ球、同クローニ化細胞、ヒト悪性化細胞もしくはハイブリドーマの細胞培養やこれらの細胞を起源として製造されるヒトIL-2を含有することを特徴とする癌、細菌感染、ウイルス性疾患、免疫不全症、自己免疫疾患などを含む免疫疾患患者に臨床適用することのできる免疫疾患の治療、予防剤に関するものである。

今日、免疫療法は、医学の広い分野において新しい治療、予防方法として期待されはじめている。例えば、感染症の分野ではオポチニスティック・インフェクションズ(Opportunistic infections)は、新生児の機能的免疫不全、癌患者、骨髓など移植適用患者、ステロイドや化学療法剤投与により免疫抑制の惹起された患者、老人などに頻発し、緑膿菌感染などはとくに重篤な症状をもたらす。従前使用されている抗生物質は、上述の免疫機能

- 3 -

いる1, 2の免疫療法剤は、細胞に対し直接細胞毒作用も併せ持つという化学療法剤的性格を有する。従つて、癌患者に真に免疫療法剤として適用され既に明確な臨床効果が第3相試験で確認されているものとしては、本発明者らになるレンチナンを挙げができるのみである。レンチナンの抗腫瘍作用機構としては、リンホカインとの相乗作用による免疫エフェクターの誘導増強作用が重要な役割を果たしていると考えられるが、レンチナンの投与時間によつては生体内のリンホカイン量が欠如していると充分の効果の発現しない同系癌の系も存在する。なお、レンチナンの臨床効果については、たとえば、「癌と化学療法」第8巻第944～966頁(昭和56年)を参照。

また、従前開発中の免疫活性物質の多くには副作用の観察される場合もあり、この意味でも生体由来でその特徴的かつ特異的な作用の詳らかな生体由来免疫活性物質を薬剤として開発することがその有効性への期待とともに、待ち望まれている。

一方、作用機構よりみた場合、開発中の免疫活

不全または免疫抑制状態においては殆んど有効性を示さない。

ウイルス性疾患においても、多大の恩恵にも拘わらず充分治療効果を示す化学療法剤は未だ臨床上通用されるには至らず、インターフェロンについても物質の性状、生産規模、作用機構など幾多の問題を抱え本格的臨床使用に至るまではその有効性は明確でない。また、インターフェロンの場合には、薬剤として適用されるヒトインターフェロンそのものが動物では効能を発揮せず、種特異性の存在のため薬剤の開発に必須の動物実験ができないという限界がある。

癌患者においても、上述の感染症、ウイルス性疾患と薬剤開発の状況は類似する。患者における免疫機能の如実な低下、抑制が立証されるにつれ第4の療法としての免疫療法には大きな関心が寄せられている。癌に対する免疫応答を増強、修復するのみでなく、癌患者における一般免疫能の改善は宿主機能の改善として有用であるとも言わかれている。従前癌患者に医薬品として使用されて

- 4 -

性物質の多くは免疫エフェクターの内、活性化マクロファージの誘導増強作用により治療効果の期待されるものであり、本エフェクターは標的に対し非特異的に作用するもので、厳密に規定された特異性は有しない生体防禦機構賦活物質である。

特異的免疫応答の発現に重要な役割を担うものとしてはアリンバ球があり、免疫エフェクターとして標的に特異性を示す細胞障害性アリンバ球が重要な作用を有することが示唆されている。

本発明の構成要素である物質ヒトIL-2は、上述のアリンバ球の活性化、増殖に重要な働きを示すことが *In vitro* の基礎実験で示されている生体由来の微量生理活性物質として規定しうる。

In vivo 動物実験においては、本IL-2の作用は未だ不明であり、他のモノカイン、リンホカインを含有するネズミIL-2を粗粗成物とするものについて免疫機能の修復が若干報告されているにすぎず、またヒトIL-2については動物実験においてその作用、免疫活性、薬効の何れもが不明である。なお、ネズミIL-2はヒトIL

- 5 -

- 2 は分子量をも異にする別物質である。このようにヒト I L-2 の薬剤としての効果即ち治療・予防効果は全く不明である。このように、ネズミ I L-2 については若干の免疫活性の予知されたものであるが、桜井欽夫ら「悪性腫瘍に対する免疫療法剤の評価法に関する」医薬品研究 11巻 746 (1980) に従えば免疫活性を示すことは直ちに薬効を示すものでないことが規定されている。

一般に免疫療法においては、種々の抗原もしくは抗原含有物からなる免疫原即ちワクチンを投与する所謂能動免疫の試みもあるが、生体側の免疫機能が欠損もしくは不全状態では、癌患者、感染症患者、ウイルス性疾患患者をとわず殆んど効果を上げない。液性免疫の増強により疾患の治療、予防を意図する場合には、上述のワクチンとともに液性免疫の非特異的な扱い手の一つである免疫グロブリンを投与する試みがなされつつある。細胞性免疫の増強による治療、予防が期待される疾患に対しては液性免疫におけるヒト免疫グロブ

- 7 -

により免疫系疾患に顕著な薬効の得られることを見出すとともに、ヒトリンパ球、同クローニ化細胞、悪性化細胞、ハイブリドーマの細胞培養により得られるヒト I L-2 を大量に製造、単離・精製する技術を既に完成しており、こうして得られた他のリンホカイン、モノカインを含有しないヒト I L-2 を用い動物実験でその免疫疾患に対する薬効を確認するとともに、ヒト I L-2 により免疫エフェクターが確かに生成されることを立証し、上に詳述した現在の免疫療法のかかえる諸問題を解決する新しい免疫療法剤を発明、完成した。

即ち本発明はヒト I L-2 単独又は他物質との併用によつて始めて免疫系疾患に対する画期的な新免疫療法剤としての薬効を見出し、免疫療法の新しい進歩に寄与するところ大なる有用な免疫療法剤に関するものである。

本発明に用いられるヒト I L-2 は、たとえば、ヒト末梢血、扁桃腺、脾臓等より得られるリンパ球を単離もしくはホルボールエステルの存在下で 12 ~ 48 時間リンパ球マイトジエンであるフ

- 8 -

リンに対応する生体由来免疫活性物質が臨床に提供されず、ワクチンを用いる能動免疫は期待されつつも、今のところ患者に適用を試みることが不可能である。

以上述べてきたように、種々の免疫疾患に対する従来の免疫療法は非特異的免疫療法に属するものであり、T リンパ球を介する細胞性免疫応答を増強もしくは調節することによる特異的免疫応答の人工的制御による治療は歴史には未だ試みられていないか不十分である。能動免疫としてのワクチン療法は免疫機能に障害のある実際の患者には効果が弱く、殺細胞作用を中心とする化学療法剤や制菌作用のみの抗生物質の投与では種々副作用が惹起される。

本発明者らは、T リンパ球特異的免疫アジュバントであるレンチナンの作用を詳細に検討する中で、免疫応答を制御するには、リンホカインに対する免疫エフェクター前駆細胞の応答性を改善することとともに、免疫エフェクター誘導を行なう 1 次シグナルとしてのリンホカインを投与すること

- 8 -

イトヘマグルチニン (PHA) 、コンカナバガシ A (ConA) 、プロテイン A (ProA) 等で刺激して得られる。また、これらヒトリンパ球をプールして、Raji 細胞、Paudi 細胞で代表されるヒト B-リンホblast (B-lymphoblast) の存在下に上述の T マイトジエンで刺激すると一層高活性のヒト I L-2 が得られる。更に、本発明者らは、ヒト T 白血病細胞株や T リンパ細胞株を培養し、血清添加または血清アルブミン添加無血清培地や血清アルブミンすら含まぬ合成培地で上述の T リンパ球マイトジエンによる刺激を含有する工程でもヒト I L-2 を調製できることを見出した。この場合にもヒト B-リンホblast の共存やホルボールエステルの共存は産生能の増大に有効である。また、本ヒト細胞株をクローニ化して得られるクローニングの幾つかはマイトジエン刺激なしに自発的にヒト I L-2 を産生することも見出された。また、ヒトリンパ球や上述のヒト細胞株を細胞融合して得られるハイブリドーマより T リンパ球マイトジエンの存在もしくは非存在下

- 10 -

に產生されるヒトIL-2も、本発明に用いることができる。更には、上述の細胞よりえられたメタセンシヤー-RNA(mRNA)を利用してリコンビナント-DNA(recombinant-DNA)を作成する遺伝子工学的手法で作成されるヒトIL-2も、その生物活性が後述の範囲に入る限りにおいて、本発明の薬剤に含有されるヒト細胞由來のヒトIL-2である。

上述の如き細胞培養法により培養上清に生成、蓄積されたヒトIL-2は、通常の単離、精製法によつて濃縮、精製するとよい。即ち、塩析、濃縮、真空透析、ゲル媒過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、調製用等電点電気泳動、ゲル電気泳動法等の種々の方法を單独にまたは適宜組み合わせて用いる。

本発明の実施例において用いられるヒトIL-2は、培養上清を4℃において限外濾過濃縮器ホロフアイバー-HIP6(アミコン社製DC2型)を用い短時間の間に約10~20倍濃縮し、次いで85%硫酸安で塩析し、セファデックスG-15

- 11 -

[REDACTED]で蛋白分解酵素で失活し、56℃1時間熱処理安定で、pH2.0~8.0の範囲で安定である。

ヒトIL-2の活性は、次のようにして検定した。

組織培養プレートの個々のくぼみ(well)に、活性を検定しようとする検体を適當な濃度範囲で2段階希釈し100μLずつ分注した。そこにギリスラ(ネーチュア(Nature)288巻154頁(1977))によつて教示された方法に従つて作成した活性化Tリンパ球株を 4×10^6 個/100μLの濃度にて100μLずつ各くぼみに添加した。37℃、5%CO₂含有空気の通気下20時間培養し、ここにトリチウム化チミジン0.6μCiを加え、4時間培養し、この分野において良く知られた方法により細胞を採取し細胞内に取り込まれた放射線量を測定した。ヒトIL-2の比活性は、トリチウム化チミジンの取り込みの最高値の60%の値の取り込みを示す検体の希釈度のプロピクトプロットより算出した。又、ヒトIL-2

- 13 -

(ファルマシア社製)で脱脂後、DEAEセルロースで段階溶出を行ない、pH7.6の0.06Mトリス緩衝液での溶出区分をプールしたのち[REDACTED]乾燥を行ない、次いでフェニルセファデックスカラム(ファルマシア社製)を通して、更に調製用等電点電気泳動装置(ファルマシア社製PBE3000)にてファルマシア社製ファルマライト(pH6~8)で展開し、単一バンドとして得られたものである。上記凍結乾燥品を実施例に示すようにコントロールドボアガラスピーズカラムクロマトグラフィー及びオレンジセファロースクロマトグラフィーに付してもよい。

本精製操作によりヒトIL-2は、後述の活性検定法により、比活性はプロットを問はず 2×10^6 unit/mg以上を示した。

このようにして得られたヒトIL-2は、ギリスラ「インターロイキン2依存性の細胞障害性T細胞株の培養」(Immunological Reviews 64巻81~109頁(1981))に示されるものと類似の物性を示し、分子量15,000 [REDACTED]

- 12 -

の活性を検定するために、アロキラー-T細胞の記憶細胞に検体を添加し、37℃で3~4日培養後、出現したアロキラー-T細胞による標的細胞の細胞障害度を⁵¹Cr標識標的細胞よりの⁵¹Crの上清への遊離でも測定を行なつたところ、前述の活性化Tリンパ球の増殖をみる方法での測定値と相關のあることを確認した。

該分野で用いられるIL-2の活性検定法と称せられるものには様々なものがあるが、必ずしもIL-2の特異的活性検定法でないものがあり、Tリンパ球よりもしくは共存マクロファージ単球より生成する他のリンホカインやモノカインの共存がIL-2の特異的活性検出を妨害している場合が頗るである。上述の活性化Tリンパ球の増殖をみる方法が現在最も信頼されるヒトIL-2の特異的検出法である。

本発明者らは、ヒトIL-2の薬剤としての発明を完成した。

上述の、他のリンホカイン、モノカインが含有されている粗ヒトIL-2を用いたのでは、藻薙

- 14 -

作用の本体が何に由来するのか定かではないため臨床に適用する場合に薬剤の投与時期、投与量を明確に規定することが困難である。

本発明になる薬剤に含有されるヒトIL-2に他のリソホカインであるTリンパ球代替因子、コロニー刺激因子、免疫インターフェロン、インターロイキン1、マクロファージ活性化因子が含まれているかどうかは、当該分野においてよく知られる方法により検定される。簡単に記すと以下の如くである。(1)Tリンパ球代替因子の存在しないことは、本薬剤中にTリンパ球を抗 Thy 1 抗体により除去した脾臓細胞中に抗体産生細胞を出現させる活性がないことにより検定される。(2)コロニー刺激因子の存在しないことは、骨髄細胞を *in vitro* でメチルセルロース中で培養する際、本薬剤を添加しても骨髄細胞にコロニー形成が見られないことにより検定された。(3)免疫インターフェロンの活性の存在しないことは、本薬剤中に抗ウイルス直接作用のないことにより検定される。(4)IL-2非産生細胞株 LBRM33-1A5 は

- 15 -

細菌感染、ウイルス性疾患や免疫不全症を含む免疫系疾患においてTリンパ球機能が重要な働きをしていることは既に明確にされている。

本発明を構成するヒトIL-2は、活性化もしくは抗原で感作されたTリンパ球のクローンを拡大し増殖する作用を有することが確認され、Tリンパ球機能異常の関与する疾患に対し療理効果を発現することが期待される。

以下、本発明を構成するヒトIL-2を用いて見出された療理効果を列記する。(1)マウス脾臓細胞 FBL-9 に対し生成し長期維持培養されている正常な細胞障害性Tリンパ球株 CTL-L-2 の増殖の顕著な促進効果。(2)主要組織適合性抗原(H-2)の不適合な脾臓細胞の組み合わせで生成されたアロキラーTリンパ球、リンパ球と腫瘍細胞の混合培養で生成されたアロキラーTリンパ球およびバブテン特異的H-2支配キラーTリンパ球の増殖の顕著な促進効果およびこれらキラーTリンパ球の記憶細胞よりのキラーTリンパ球(CTL)の抗原非存在下での誘導効果。(3)PNA⁺(ビーナ

ンターロイキン1)を4時間作用させるとIL-2産生細胞に転換し、ConA 刺激によりIL-2を産生する。LBRM33-1A5 に本薬剤を4時間作用させてもIL-2産生細胞への転換は生じないことから、本薬剤がインターロイキン1を含まないことが検定された。(4)マクロファージ活性化因子の活性の存在しないことは、本薬剤を *in vitro* でマクロファージに作用させても、マクロファージに対し抗腫瘍細胞活性(腫瘍細胞のDNA合成阻害)を誘起しないことにより検定される。

本発明者らは、前述の技術の工夫により、種々の方法で得られ単離、精製され明確に規定された性状と機能を有し、他のリソホカイン、モノガイシンを含有しないヒトIL-2を大量に生産し、その薬理作用を検討することによりヒトIL-2が癌、細菌感染、ウイルス感染、免疫不全症、自己免疫疾患を中心とする免疫系疾患に明確な薬効的なわち治療、予防効果を有することを見出し新しい免疫療法剤を発明した。

- 16 -

(5)・アグルチニン結合性)脾臓細胞にConA を共存させる培養系において、顕著な増殖誘導効果(本効果はインターロイキン1では観察されない)。(6) *in vitro* で脾臓細胞のナチュラルキラー細胞(NK)活性の増強効果。(7) *in vitro* で脾臓細胞のNK活性を増強する場合のインターフェロンまたはインターフェロン誘起物質(インデューサー)との相乗効果。(8) *in vivo* で脾臓細胞のNK活性を増強するにあたり *in vitro* レンチナシ投与との相乗効果。(9)同系癌担癌の免疫機能の抑制されたマウスの脾臓細胞を応答細胞とするキラーT細胞培養系において *in vitro* で本薬剤を修復、増強する効果。(10)同系癌担癌のNK活性の抑制されたマウスの脾臓細胞のNK活性を修復、増強する効果。(11)通常CTLの誘導されない、Ia⁺マクロファージ(インターロイキン1産生細胞)非存在下のH-2不適合な脾臓細胞の混合リンパ球培養においてアロキラーTリンパ球を誘導する効果。

以上(1)～(11)に示した効果は本発明を構成するヒ

- 17 -

ト I L - 2 が確かに他のリノホカインとは異なること、T リンパ球の増殖維持、分化活性を有すること、in vitro において免疫エフェクターとして重要な CTL、NK 活性を誘導増強すること、これらの免疫エフェクターの誘導がレンチナン、インターフェロンやインターフェロン誘起剤と相乗効果を示すこと、またこれらの免疫エフェクターの誘導の修復、増強が免疫機能の抑制された生体のリンパ球に対しても発揮されることを如実に示すものである。単に免疫活性を示すのみでなく、免疫疾患の治療、予防に重要な証拠となる免疫エフェクターたる CTL、NK の活性化の増強および修復をなすことは大きな意義を有する。

次に in vivo のヒト I L - 2 投与により確認された生物活性、免疫活性を列記する。(A) NK 活性の単独投与もしくはインターフェロンと併用投与による増強効果。(B) アロ CTL 活性の増強効果。(C) 同系癌担癌マウスに単独もしくはレンチナンと併用して投与した時の CTL 誘導増強活性。(D) 羊赤血球(SRBC)等の抗原を用いる遲延型過敏症

- 19 -

への投与によつても免疫疾患の治療、予防に有用な効果を示すことが明らかになつた。特に I L - 2 投与により生体内で特異的免疫エフェクターとしてはたらく CTL 誘導機能を顕著に増強させること及び非特異的免疫エフェクターとしてはたらく NK 活性化を顕著に増強させることに始めて成功したのは本発明の重要な知見である。老令生体では種々の免疫機能が低下していることが知られており、また最近ギリスら (J. Clin. Invest. 67巻937頁(1981)) は老令生体で I L - 2 の生産能の低下していることを示しており、ここに示した in vivo での効果は I L - 2 が実際に薬剤として汎く免疫機能の改善に有用であることを示す。又、上述(A)～(D)の効果に示すとおり、I L - 2 とレンチナンもしくはインターフェロンとの in vivo での相乗効果も明らかである。

更に、(E)、(F)に示すように免疫原たる抗原、腫瘍に対する細胞性免疫応答の in vivo での増強効果は、ヒト I L - 2 が免疫原たる抗原と共に投与した場合に免疫アジュバントとして作用すること

- 21 -

反応を指標とする細胞性免疫の増強効果。幼鼠癌抗原による遅延型過敏症反応を指標とする特異的免疫応答の増強効果。(G) 同系癌担癌マウスにおける免疫抑制状態への投与による CTL 誘導、NK 活性化、遅延型過敏症反応を指標とする細胞性免疫の修復効果。(H) T リンパ球機能の欠損したヌードマウスへの投与による抗 SRBC 抗体産生、CTL 誘導機能の発現効果。

以上(E)～(H)に示した効果は、ヒト I L - 2 が、in vitro でなく in vivo においても 10～100 unit の投与により、生体内での吸収・分解・代謝にも拘らず、確かに免疫活性を示すことを始めて見出したことを示すものであり、in vitro で観察されたように、in vivo においても T リンパ球の増殖、分化活性を有すること、CTL、NK の如き重要な免疫エフェクターの誘導増強作用を有すること、またこれら免疫機能が抑制、不全、欠損の生体においても、ヒト I L - 2 の投与でこれらの機能が修復、増強されることを示すものである。このことにより始めてヒト I L - 2 が生体

- 20 -

を示しており、能動免疫におけるヒト I L - 2 の薬剤としての有用性を示すものである。

本発明者らは、最後にヒト I L - 2 の動物実験における薬効試験を実施し、以下に列記する効果を見出した。既に述べた(A)～(H)の効果より明らかなように、ヒト I L - 2 の薬剤としての有用性は以下に列記する範囲にとどまらず、当業者が容易に類推・実施しうる免疫系疾患全般を含むものである。

前記効果とは、すなわち、(1) 同系癌担癌動物の癌摘出手術後のヒト I L - 2 投与による延命効果、(2) 同系癌に対する化学療法 RT 207、サイクロフォスファミド投与との併用による延命効果、(3) 脳癌ワクチン投与との併用による同系癌担癌動物の延命効果、(4) I L - 2 単独投与による同系癌の退縮、延命効果、(5) 細菌感染に対する延命効果、(6) ウイルス性疾患に対する延命効果、(7) レンチナンとの併用による同系癌退縮効果である。

以上の効果より明らかな様に本発明者らの発明になるヒト I L - 2 は、前述の様々な免疫活性、

- 22 -

生物活性にもとづき、(ii)～(iv)に述べた様な *in vivo* での実際に医学分野において有用な薬効を示す、しかもこれらの効果が確かに IL-2 によるものであり、他の微量成分によるものでないことが判明した。

本発明になるヒト IL-2 は、 2×10^4 unit/ ml 以上の比活性を有する程度に一旦精製されたものが最もしく、対象の疾患、患者の病状、免疫機能を配慮して使用量、使用回数を決める。また、投与経路は治療効果の実施例においては全て静脈内投与を示しているが、用法として本投与経路にのみ限局されるものではない。

上記比活性より弱い比活性を有するヒト IL-2 を含有する薬剤や、他のリンホカイン、モノカイン等の微量成分を含有する薬剤も、本発明の趣旨よりして、本発明の技術的範囲に含まれることは明らかである。本発明は、ヒト IL-2 そのものに、詳述した *in vivo* の治療、予防効果のあることの発見により完成したものであり、本効果を妨害しない他成分の含有は本発明の範囲に含まれる。

- 2 3 -

度で 0.5 % 牛血清アルブミン (B S A) を含有する無血清培地 R I T C - 5 5 - 9 1 0 0 0 μl に懸滴し、ファルコン社製回転培養瓶に入れ、ここに ConA を $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、密栓後 37°C にて 24 時間回転培養した。培養終了後、培養上清を遠心操作で回収した。本培養液の IL-2 活性は 4096 単位/ ml であった。

Jurkat - F H C R C 株および Jurkat - P 1 8 8 6 株を同様に処理して得られた IL-2 活性は各々 64 および 288 u/ ml であった。

ヒト末梢リンパ球を T 細胞成長因子の存在下に培養しクローン化した T リンパ球またはヒト T リンパ球とヒト T 白血病細胞株 C E M を細胞融合して得られたハイブリドーマを同条件下で ConA で刺激した場合は、各々 24 および 12 u/ ml の IL-2 活性を示した。

上述の Jurkat - 1 1 1 株を使用して得られた IL-2 を含有する培養上清は、まずガラスフィルター過濾器 H I P 5 (アミコン社製 D C 2) を用いて 10 倍に濃縮し、8.5 % 硫安で凍結

以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

実施例 1 : IL-2 の製造

ヒト末梢リンパ球を、採血後該分野でよく知られた方法により、採取し 1×10^6 / ml の細胞密度となし、ここにヒト B リンパ球細胞株である Raji 細胞を $1 \times 10\%$ ml の細胞密度で等容量添加し、更にコンカナバリン A (ConA) $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ホルボールミリスチート・アセテート (P M A) $1.0 \mu\text{M}/\text{ml}$ を添加し、最終容積 2000 ml となした。これを 10 ㍑のジャー式攪拌培養槽に入れ 37°C にて 48 時間培養し、遠沈操作により細胞を分離して IL-2 を含む培養上清を得た。用いた培地は 1 つの牛胎児血清を含むローズウエルパーク・ノモリアル・インスチュート (R P M I) 1640 培地で、得られた培養上清は $360 \text{ u}/\text{ml}$ の IL-2 活性を含有していた。なお、u は unit の略で、「単位」を意味する。

一方、ヒト T 白血病細胞株 ジュルカット (Jurkat) - 1 1 1 株を 4×10^6 / ml の細胞密

- 2 4 -

度で 0.5 % 牛血清アルブミン (B S A) を含有する無血清培地 R I T C - 5 5 - 9 1 0 0 0 μl に懸滴し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでイオン強度を変化させて段階溶出し、 0.06 M トリス緩衝液 (pH 7.6) で溶出する分画をブールした。このブール分画を凍結乾燥後コントロールポアーガラス (C P G) ビーズ (360 A° 、ナカシ葉品製) を用いるクロマトグラフィーを行ない、 0.3 M グリシン塩酸緩衝液にて溶出し、IL-2 活性画分をブールした。このブール画分を 0.01 M トリス緩衝液 (pH 7.6) でオレンヂセファロースカラムに吸着させ、 0.01 M トリス緩衝液 (pH 7.6) 、 1.0 M NaCl にて溶出し、得られた IL-2 活性画分を 5.0 mM 重炭酸アンモニウム溶液に対し透析後、凍結乾燥により重炭酸アンモニウムを除去し、得られた画分を調製用電気泳動装置 F B E 3 0 0 0 (ファルマシア社製) を用いて展開し、平板ゲルを 30 片に切り、各ゲル中より蛋白質を滅菌蒸留水に対し溶出し透析 IL-2 の活性、蛋白量を測定し、本発明に用いるヒト IL-2 標品を得た。

- 2 6 -

本精製工程の概略を表1に示す。

表1 I L - 2 の精製

I L - 2 グレード	容 量	活 性	全活性	比活性
	(ml)	(単位/ml)	(単位)	(単位/ μ g/蛋白)
(A) 培 育 上 清	10000	4.1×10^8	4.1×10^7	1.5×10^4
(B) DEAEクロマト面分	500	9.2×10^4	4.6×10^7	8.2×10^3
(C) CPGクロマト面分	50	5.5×10^5	2.8×10^7	8.1×10^4
(D) オレンジセラフアロース面分	10	2.7×10^6	2.7×10^7	3.6×10^4
(E) 等電点電気泳動面分	10	1.1×10^6	1.1×10^7	8.2×10^4

なお、ここに得られたグレードEのI L - 2は、マウスに静注した時100万単位にても全く死亡例がみられず、ヒト細胞の培養細胞に対しても10万単位/mlの濃度でも何等の殺細胞作用は示さなかつた。グレードA, Cのものは10万単位/mlの濃度で細胞の成育を阻害し、何等かの直接細胞毒物質の含まれることを示した。

- 27 -

図1Bより精製度の低いI L - 2 検体中にはI L - 2 に対し阻害活性を示すインヒビーターの人についていることが判明した。

なお、図1A、図1Bにおいて、I L - 2 グレードは表1に示すものと同じである。

実施例3：in vitroにおけるキラーTリンパ球の記憶細胞よりのキラーTリンパ球の効率促進効果

CBA/Jマウスの脾臓リンパ球 4×10^6 と2,000レントゲンのX線照射を受けたBALB/Cマウス脾臓リンパ球 1×10^6 を2mlのタリック培地（牛胎児血清濃度5%）に懸滴し、Nunc社製24穴培養プレートで10日間培養し、アロキラーツリンパ球の記憶細胞を得た。本記憶細胞のキラーアクティビティは認められなかつた。

この記憶細胞を 6×10^4 細胞/穴宛96穴のマトリクスプレートに添加し、ここに2段階希釈したI L - 2 検体を添加し最終容積200μlにてタリック培地中37℃にて5%炭酸ガスインキュベ

実施例2：in vitroにおけるTリンパ球の増殖促進効果

活性化Tリンパ球株 CTL-Lを $1 \times 10^4/\text{ml}$ の細胞密度で24穴のNunc社製の培養プレートに1ml/wellの量で添加し、ここにI L - 2 検体を10μlを添加して以後24時間ごとに本Tリンパ球数の増加を観察した。培養に用いた培地は、RPMI 1640培地で牛胎児血清5%含むもので、37℃、炭酸ガス（7.5%）インキュベーター中にて培養した。■■■細胞をエオシン染色後顕微鏡にて生細胞および死細胞細胞を計数した。

結果を図1Aに示す。

また、CTL-Lを $1 \times 10^4/\text{ml}$ の細胞密度でRPMI 1640培地に添加し、2倍希釈列にて希釈したI L - 2 サンプルを1ml当たり100μl添加し、1ml/wellの容積で24穴プレート（Nunc社製）にて培養した。96時間後細胞をエオシン染色した後顕微鏡にて生細胞及び死細胞数を計数した。

結果を図1Bに示す。

- 28 -

ーター中3日間培養した。

培養液を洗浄後新鮮な培地と常法により⁵¹Crで標識したPBL-X₁マストサイトマを $1 \times 10^4/\text{穴}$ 宛添加し3時間37℃の5%炭酸ガスインキュベーター中にて培養し、遊離する⁵¹Cr量をオートガンマカウンターで測定することにより標的癌細胞PBL-X₁の傷害を測定し、記憶細胞よりのキラーツリンパ球の誘導効果を測定した。

図2に結果を示す。I L - 2 グレードは表1のものと同じ。

実施例4：in vitroにおけるナチュラルキラーアクティビティの増強効果およびレンチナン、インターフェロンとの併用効果

C3H/HeNマウスの脾臓細胞を常法により採取し单細胞化したのち、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）に 1×10^7 細胞/2mlに懸滴し、Nunc社製24穴培養プレートに添加し、ここにI L - 2 標品を100μl宛添加し、37℃、5%

- 29 -

各炭酸ガスインキュベーター中にて 24 時間培養し、得られた細胞を新鮮培地 2 ml に角懸滴し、各 1 ml 実小試験法に分注し、ここに ^{51}Cr 標識 YAC-1 細胞を 2×10^4 空添加し、4 時間のインキュベーション後、上清に遊離される ^{51}Cr の量をカートガンマカウンターで測定することにより標的細胞 YAC-1 の傷害度を求め、ナチュラルキラー細胞活性の活性化能を測定した。

レンチナンとの併用効果については、C3H/HeN マウスの脾臓細胞を採取する 24 時間前に 1 mg/kg の投与量でレンチナンを静脈注射しておいた C3H/HeN マウスの脾臓細胞を用いることにより検定した。

α-インターフエロンとの併用効果については、Nunc プレートに IL-2 を添加する際に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α-インターフエロンを添加することにより検定した。

結果は図 3 に示す。使用した IL-2 は表 1 のグレード E のものである。

- 31 -

実施例 5 : in vivo におけるキラー T リンパ球誘導増強効果およびレンチナンとの併用効果

C57BL/6 マウスの脾腔内に P815 \times X_1 マストサイトーマ細胞を $1 \times 10^6 / 0.5 \text{ ml}$ 生理食塩水懸濁液として投与した。3 日後と 5 日後に IL-2 を $100 \mu\text{g}$ ずつ尾静脈より注射し、10 日目に脾臓細胞を採取し、これらエフェクタ細胞と ^{51}Cr 標識標的細胞 P815 を 100 : 1 の比で混合し、3 時間の ^{51}Cr 遊離試験により、キラー T リンパ球誘導増強効果を測定した。

表 3 に示す通り、IL-2 投与群で生理食塩水投与の対照群に比し顕著な増強効果が認められるとともに、本増強効果がレンチナンの 0.1 mg/kg (1 日目) の投与で更に増進されることが判明した。

実施例 5 : in vivo における NK 活性の増強効果

およびレンチナンとの併用効果

C3H/HeN マウスの尾静脈に IL-2 投与 0.1 mg を静脈注射し、3 日後に同マウスの脾臓細胞を採取し、 2×10^6 細胞/ml 実 DMEM に懸滴し、ここに ^{51}Cr 標識 YAC-1 細胞 $2 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ 空添加して、実施例 4 同様に ^{51}Cr 遊離試験を行ない NK 活性の活性化効果を検定した。

レンチナンとの併用効果の検定は IL-2 投与の 1 時間前に同一マウスに 1 mg/kg のレンチナンを腹腔内投与することにより検定した。

表 2 IL-2 の NK 活性化効果 (in vivo)

IL-2 投与量 (単位/匹)	レンチナン投与 (1 mg/kg) 有無	YAC-1 の傷害度 (%)	
		E 群	C 群
対照(生食)	対照(生食)	22.3	22.3
対照(生食)	+	44.6	44.6
5	-	48.2	30.1
	+	62.9	48.3
25	-	64.2	45.3
	+	80.3	57.2
100	-	72.2	23.1
	+	81.3	40.8

※ 同じた IL-2 の精製グレードを示す(表 1 参照)。

- 32 -

表 3 IL-2 のキラー T リンパ球誘導増強効果 (in vivo)

IL-2 投与量 (単位/匹)	レンチナン投与 (0.1 mg/kg) 有無	P815 の傷害度 (%)	
		E 群	C 群
対照(生食)	対照(生食)	25.2	25.2
対照(生食)	+	42.3	42.3
5	-	38.6	17.3
	+	70.4	20.6
25	-	60.3	26.4
	+	80.4	40.3
100	-	80.6	30.2
	+	82.3	40.4

※ 用いた IL-2 の精製グレード (表 1 参照) を示す。

実施例 7 : 同系癌担瘤マウスに投与することによる抗同系癌キラー T リンパ球誘導の増強効果およびレンチナンとの併用効果

DBA/2 マウスの皮下に $5 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ の P815-X₁ マストサイトーマを移植した。移植

- 33 -

後18日目にIL-2を100 unit / 0.1 ml尾静脈より注射し、更に5日後に脾臓細胞又は腫瘍細胞を採取し各々単細胞化した。腫瘍細胞は更にフィコール(ファルマシア社製)の密度分画を行ない、リンパ球(88%純度)を集めた。各々をエフェクター：標的細胞=100:1で⁵¹Cr標識P815を標的細胞として4時間の⁵¹Cr遊離テストを実施し、脾臓細胞及び腫瘍局所中の同系統に対するキラーTリンパ球活性を検定した。

表4に示す通り、IL-2投与により始めて脾臓細胞及び腫瘍局所中に癌細胞を殺すキラーリンパ球の産生がみられた。

表4 同系統に対するキラーリンパ球産生の増強効果

IL-2投与量 (単位/匹)	(1) レンチナン投与 (1mg/m ²)の 有無		(2) P815傷害活性(%) 脾臓細胞 局所リンパ球	
	0	6	28	32
対照(生食)	対照(生食)	0	0	
対照(生食)	+	6	4	
100	-	28	32	
	+	42	54	

- 3 5 -

対照として、MM46腫瘍を移植しないC3H/HeNマウスにIL-2を同量静注したもの及びMM46と異なる腫瘍であるMM102抗原を同蛋白相当量注射する系などをおいたが結果を図4に示す。

IL-2は表1の精製グレードEのものを使用。図4より明らかなように、MM46担癌マウスにIL-2を投与した後、腫瘍抗原を投与した場合のみ

MM46腫瘍に対する特異的な遅延型過敏反応の増強が認められ、IL-2投与は同系統腫瘍マウスにおいて当該腫瘍に対する特異的細胞性免疫反応を増強することが確かに立証された。

実施例8：免疫抑制動物における免疫不全状態の回復効果

IL-2が免疫抑制状態にある動物に投与された場合にTリンパ球機能の回復を通じ種々の免疫応答を回復させることを立証するため、担癌マウスにおいてIL-2投与により免疫不全状態が修復されるか否かを検定した。即ち、DBA/2マウスに $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ のP815-X₆マストサイトーマを皮下移植し、腫瘍が充分に大きくなつ

(I) 用いたIL-2は精製グレードEのもので、Cのものでは本増強効果は單独でもレンチナン併用群でもみられなかつた。グレードは表1と同じ。

(II) レンチナンはP815移植後、15、16、17日に各1mg/m²ずつ腹腔内投与した。

実施例8：腫瘍抗原に対する特異的細胞性免疫応答の増強効果

C3H/HeNマウスに $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ の同系統腫瘍MM46を移植し、腫瘍の大きくなつた移植後13日にIL-2を100u/0.1ml生理食塩水の投与量で尾静脈より注射した。一方、MM46腫瘍抗原を3M-KClで抽出する常法で作成し、上記同系統MM46腫瘍担癌マウスの足蹠に0.60mg蛋白相当量をMM46移植後20日目、IL-2投与後7日に局所注射し24時間後の足蹠の肥厚を測定することにより、同系統腫瘍担癌マウスの腫瘍抗原に対する特異的細胞性免疫反応である癌特異的遅延型過敏症反応の増強効果を検定した。

- 3 6 -

た時期にIL-2を投与し、(I)NK活性化の修復、(II)アロキラー産生能の修復、(III)羊赤血球SRBCに対する遅延型反応の修復の3つの効果を検定した。

(I) NK活性化

P815-X₆の移植後、16日、18日に各50u/0.1ml生理食塩水のIL-2を尾静脈より注射して移植後20日目の脾臓細胞を採取し、エフェクター細胞：標的細胞=200:1にて、⁵¹Cr標識YAC-1細胞を標的細胞として4時間の⁵¹Cr遊離テストを行ない、標的YAC-1細胞の傷害度率を測定することによりNK活性を測定した。

正常(非担癌)マウスのNK活性は19.8%であつたのに対し、P815-X₆担癌マウスでは7.6%で有意に低下がみられたが、ここに精製グレードE(表1参照)のIL-2を静注した群では22.3%と顕著なNK活性化の低下状態の修復効果がみられた。

NK活性化の低下は正常DBA/2マウスに

- 3 8 -

P 815 担癌(腹水型)マウスの腹水液を 0.5 mlずつ 3 回腹腔内投与しても観察されたが(19.8% → 6.4%), この場合にも上記同様の IL-2 投与で NK 活性は 23.4% まで修復された。

(ii) アロキラー T リンパ球産生能

(i) 同様に処理し、P 815-X₂ 皮下移植後 20 日目の脾臓細胞を採取し、本脾臓細胞を応答性細胞とし、C 67 BL/6 マウスの脾臓細胞を 2,000 レントゲンの X 線処理したものと刺激細胞とし、実施例 3 に述べたと同様の条件下にアロキラー T リンパ球誘導の混合リンパ球反応を実施した。培養開始後 5 日目に細胞を採取し、エフェクター細胞：標的細胞 = 10 : 1 にて ⁵¹Cr 標識 EL4-サイモーマを標的細胞として 3 時間の ⁵¹Cr 遊離テストを行ない、標的 EL4 細胞の傷害度を測定することによりアロキラー T リンパ球産生能を検定した。

正常マウスの脾臓細胞では本条件下に有意のアロキラー T リンパ球産生がみられるのに対し、P 815-X₂ 担癌 DBA/2 マウスの脾臓細胞で

- 39 -

更に 8 日後に 1×10^6 の SRBC を再度足蹠に注射し、24 時間後足蹠の肥厚を測定した。

図 5 に示す通り、担癌免疫不全状態で抑制された足蹠の遲延過敏反応は IL-2 の投与で正常以上の状態に修復増強されることが判明した。

実施例 10 : T リンパ球免疫機能欠損動物における免疫機能発現効果

T リンパ球機能が欠損し、従つてキラー T リンパ球産生や T リンパ球依存性抗原に対する抗体産生のみられないヌードマウスにおいて、IL-2 投与がこれらの免疫機能を発現させることを以下のごとくに立証した。

BALB/C nu/nu マウスの足蹠に 2,000 R の X 線照射をした C 67 BL/6 マウスの脾細胞 2×10^7 個を投与しアロ抗原による感作を連続 2 日行なった。抗原投与開始と同時に表 1 の IL-2 サンプル E 100 μl / 100 μl を静脈内投与し、3 日おきに 3 回投与を続けた。10 日後、この BALB/C nu/nu マウスの脾細胞 4×10^6 個を

は同産生は全くみられない。しかしながら、このような免疫不全状態においても IL-2 を投与することによりアロキラー T リンパ球の産生が顕著にみられ、IL-2 投与が免疫不全状態の動物に免疫機能の修復に働くことが判明した。

結果を表 5 に示す。

表 5 P 815 担癌 DBA/2 マウスよりのアロキラー T リンパ球産生の IL-2 による修復効果

	IL-2 投与量(単位/回) ^a			
	(生理食塩水)	20	50	100
EL4 傷害度 (%)	0	46	52	54

^a IL-2 の精製グレードは表 1 の B.

(iii) 羊赤血球に対する遲延型過敏反応

(i) 同様に処理し、P 815-X₂ マストサイトマ 1×10^6 皮下移植後 20 日目に IL-2 を 50 μl / 0.1 ml 静注された DBA/2 マウスに 25 日目に 1×10^6 の羊赤血球 SRBC を足蹠に投与し、

- 40 -

$2,000$ R の X 線処理をした C 67 BL/6 マウスの脾細胞 1×10^6 と共に 2 ml のタリック / RPMI 培地に添加し 5 日間培養し、⁵¹Cr ラベルした EL4 細胞株を標的細胞としてキラー活性を測定した。

表 6 に示すとおり IL-2 投与により、T 細胞機能の欠損したヌードマウスにキラー T リンパ球産生を誘導できた。

表 6 IL-2 の in vivo 投与によるキラーテリンパ球の誘導(標的細胞破壊率%)

IL-2 投与	エフェクター細胞数 E : 標的細胞数 T			
	500:1	100:1	20:1	4:1
-	2	-1	-2	1
+	48	21	12	2

上表において、マウス : BALB/C nu/nu ; 抗原 : C 67 BL/6 脾細胞 ; IL-2 : 表 1 のサンプル E ; 標的細胞 : EL4 ; IL-2 投与 : 100 unit / 100 μl × 3 回である。

- 42 -

BALB/c nu/nu マウスの腹腔内に抗原として羊赤血球 1×10^6 個を投与し、抗原投与と同時に表 1 の IL-2 サンプル E 100 u / 100 μL を静脈内投与し、3 日おきに 3 回投与を続けた。この BALB/c nu/nu マウスの脾細胞 0.75×10^6 個と羊赤血球 1×10^6 個を混合し、200 μL の RPMI 1-1640 培地に添加し、96 穴の平底マイクロプレート（コスター社製）に 200 μL / well の容皿で 5 日間培養した。5 日後各 well の細胞を回収しカニンガムの方法により出現した抗体産生細胞数を測定した。表 7 に示すとおり、IL-2 投与群のみに抗体産生の誘導がみられた。

表 7 IL-2 の in vivo 投与による抗体産生の誘導 (PFU / culture)

IL-2 投与	抗原量 (個 / well)	
	0	1×10^6
-	4	2
+	3	259

- 43 -

上表にて、マウス：BALB/c nu/nu；抗原：羊赤血球；培養：コスター 96 穴平底マイクロプレート；IL-2 投与：100 unit / 100 μL × 3 回である。

実施例 1-1：癌病葉摘出手術動物に対する延命効果

C57BL/6 マウスに同系腫瘍である EL-4 を 3×10^6 / 0.1 mL 皮下移植し、腫瘍が増大した 14 日目にナイロン糸を用い、本固型腫瘍を外科的に採取し、傷口をカットバンドで縫合し、翌日に IL-2 を 100 u / 0.1 mL 静注し、以降 4 日おきに 3 回、合計 4 回同量の IL-2 を静注し、各群のマウスの生存を測定したところ、表 1 の精製グレード E の IL-2 群においてのみ顕著な延命効果が観察された。

結果を表 8 に示す。

- 44 -

表 8 EL-4 摘出後の IL-2 投与の治療効果

EL-4 移植	外科手術の有無	IL-2 投与	平均生存日数	術後 30 日目生存数	
				用いた匹数	
3×10^6	-	-	28	-	
"	+	-	36	6/40	
"	+	+ ⁽¹⁾	>52	38/40	
"	+	+ ⁽²⁾	38	7/40	

III 表 1 の精製グレード E の IL-2、(2)表 1 の精製グレード C の IL-2

実施例 1-2：手術後の転移腫瘍に対する治療効果
手術後に少量残存する腫瘍細胞は免疫療法の最も期待される対象と考えられている。実験には、転移性のマウス同系腫瘍である L1210、P388D₁ および MH134 腫瘍を対象として用いた。

L1210 については、 1×10^4 個の腫瘍細胞を BDF₁ マウス足臍皮下に移植後 10 日目に移植

部位を切除した場合、切除後 1、3、5 日目に各 100 u / 0.1 mL の IL-2 を投与した群では全例が完全治癒したが、IL-2 非投与の対照群では 40 % の死亡例がみられた（図 6A）。

P388D₁ は、 1×10^6 個を BDF₁ の足臍皮下移植後同様に処置したところ、IL-2 投与群では 80 % が完全治癒したのに対して対照群では 80 % が死亡した（図 6B）。

また MH134 については、 1×10^6 個を C3H/HEN マウスの足臍皮下に移植し同様に処置したところ、IL-2 投与例は全例完全治癒したが、対照群では、術後 60 日目までに 60 % が死亡した（図 6C）。

本実験結果は、グレード E（表 1 参照）の IL-2 投与で認められたものであるが、粗 IL-2 の場合にはこの様に明瞭な効果は認められなかつた。

- 45 -

実施例 1-3：自家癌担癌動物に対する化学療法剤との併用による延命効果

9-メチルコラニスレン (MC) のオリーブ油懸濁液 ($0.5 \text{ mg} / 0.1 \text{ ml}$) を SW/Ms マウスの腹部皮下に 0.1 ml 投与し、触知法により小豆大 (0.5 cm 直径) の腫瘍発生が 15 週目までにみとめられたマウスを集め、3 群に分けた。1 群は対照群となし、1 群にはサイクロフォスファミドを $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 腹腔内投与し (1 日目)、一方他の 1 群にはサイクロフォスファミド $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与後 20、22、24、26、28、30 日目に各 $100 \text{ u} / 0.1 \text{ ml}$ の IL-2 を尾静脈より注射し、各群の平均生存日数を求めた。

対照無処置群は 45.0 日、サイクロフォスファミド単独投与群は 45.5 日、サイクロフォスファミドと IL-2 併用群では 123.8 日となり、併用群における顕著な生存日数の延長がみとめられ、IL-2 が化学療法剤との併用で自家癌に対しても抗腫瘍効果を示すことが立証された。

- 47 -

表 9 脳癌抗原との併用投与による LSTRA 担癌動物に対する延命効果

抗原 LSTRA 細胞量	移植 LSTRA 細胞量	IL-2 投与量 (単位/匹)	(2) 50 日目の生存数/死骸数	
			(生食)	
10^6	10^6	—(生食)	4/30	
10^6	10^6	50	24/30	
10^6	10^6	100	28/30	
10^6	10^7	—	0/30	
10^6	10^7	100	20/30	

(1) LSTRA 細胞を 8,000 レントゲン X 線処理したものを抗原として用いた。
(2) 用いた IL-2 は表 1 の精製グレード E のものである。

実施例 1-5：単独投与による同系癌の退縮および担癌動物の延命効果

DBA/2 マウスに 1×10^6 の P815-X₂ マストサイトマを背部皮下に移植し、14、

実施例 1-4：脳癌抗原との併用投与による同系癌動物に対する延命効果

マウス白血病細胞 LSTRA を 8,000 レントゲン照射して過敏性をなくしたものと脳癌ワクチン、すなわち、脳癌抗原として用いた。X 線照射した LSTRA 死細胞 1×10^6 を BAC⁺/C マウスの足蹠に注射し、本ワクチン注射後 5、7、9 日目に IL-2 50~100 u / 0.05 ml を静脈注射し、次いで 28 日目に LSTRA 生細胞を 10^6 足蹠に注射し、マウスの生存を観察した。

脳癌移植後 50 日目の生存数は表 9 の通りで、この場合にも脳癌抗原と併用投与された IL-2 は治療効果を示し、種々の抗原に対し IL-2 がアジュバントとして作用し、治療・予防効果を示すことが立証された。

- 48 -

16、18、20、22 日目の 5 回に分けて各回 $100 \text{ u} / 0.1 \text{ ml}$ の IL-2 を静注し、4 週目の腫瘍退縮率を観察重量より、又、100 日目の DBA/2 マウスの生存率を求めた。

グレード E の IL-2 (表 1 参照) の静注では顕著な抗腫瘍効果が腫瘍退縮効果及び延命効果において認められ、IL-2 は単独投与によつても抗腫瘍効果のあることが判明した。

結果を表 10 に示す。

表 10 IL-2 単位投与による抗腫瘍効果

皮下移植P815量 (単位/匹)	IL-2 投与量 (単位/匹)	28 日目の腫瘍 退縮率(%)	100 日目の生存数 死骸マウス数
1×10^6	対照(生食)	—	0/40
1×10^6	$100^{(1)}$	89	39/40
1×10^6	$100^{(2)}$	24	4/40

(1) 精製グレード E の IL-2 (表 1 参照)
(2) 精製グレード C の IL-2 (表 1 参照)

- 50 -

実施例1-6：細菌感染に対する延命効果

ディフコ栄養培地で培養したエセリア・コリ菌 $MS4-2$ を $5 \times 10^7 / 0.2 \text{ ml}$ 宛 ddYマウスに腹腔内投与し、本感染前3日目、1日目にI-L-2 $10 \sim 200 \mu / 0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より注射し、菌感染2日後の生存マウス数を測定したところ表1-1Aに示す結果を得た。

表1-1A E. Coli菌に対する感染防禦効果

I-L-2投与量(単位/匹/日)	生存数
対照(生食)	0/10
10	1/10
50	3/10
100	10/10
200	10/10

同じく、クレブジエラ・ニューモニア菌 $1-9$ を $5 \times 10^8 / 0.2 \text{ ml}$ 宛 ddYマウスに腹腔内注射し、感染1時間後にI-L-2 $10 \sim 200 \mu / \text{匹} \cdot \text{日}$ 投与し、感染後5日目の生存数を測定し、表

- 51 -

尚100%のマウスが生存し、I-L-2により顕著なウイルス感染の治療効果が観察された。

実施例1-8：レンチナンとの併用による同系統退縮効果

H C3H/HeNマウスに同系腫瘍MM102 $3 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ を皮下移植しレンチナンを腫瘍移植日、7日目、14日目に投与(1mg/kg、静注)すると共にレンチナン投与後2日目に $10 \mu / 0.1 \text{ ml}$ のI-L-2を腹腔内投与し、腫瘍移植後35日に腫瘍のサイズより腫瘍増殖阻止率を測定すると共に移植後70日のマウスの生存数を算出した。

表1-2に示す通り、レンチナンとI-L-2の併用による抗腫瘍効果の増進が観察された。

表1-1Bに示す結果を得た。

表1-1B K. Pneumoniae菌に対する感染防禦効果

I-L-2投与量(単位/匹)	生存数
対照(生食)	2/10
10	2/10
50	3/10
100	8/10
200	9/10

実施例1-7：ウイルス感染に対する延命効果

(BALB/c \times C57BL/6)F₁マウスに水泡性口内炎-(VSV)ウイルスを 1.2×10^6 pfu単位 $/0.05 \text{ ml}$ 当りニーテル麻酔下鼻腔より感染させてI-L-2の抗ウイルス効果を検定した。

I-L-2はウイルス感染の3日前より感染後5日目まで連日 $50 \mu / 0.05 \text{ ml}$ を静注した。対照群では8日目までに80%のマウスが死亡したのに対し、I-L-2投与群では15日目においても

- 52 -

表1-2 レンチナンとの併用による同系統退縮効果

レンチナン投与 投与量(mg/kg)投与日 (移植後日数)	I-L-2投与量 (単位/匹)投与日 (移植後日数)	腫瘍退縮率		生存数/死滅数
		対照	黒糞	
1	0	-	0	0/12
1	?	-	-2.3	2/12
1	14	-	-4.5	4/12
1	14	-	4.2	7/12
1	14	10	16	78/12

※ 表1の群群アレードEのものを投与した。

- 63 -

4 図面の簡単な説明

図1はIL-2のin vitroにおけるTリンパ球の増殖促進効果、図2はIL-2のin vitroにおけるキラーTリンパ球の記憶細胞よりのキラーテリンパ球の誘導促進効果、図3はIL-2によるナチュラルキラー細胞活性の増強(in vitro)、図4は癌特異的遲延型過敏症反応のIL-2による増強効果、図5はIL-2の羊赤血球に対する遲延型過敏反応の修復効果、図6は手術後の転移腫瘍に対するIL-2の治療効果に関する実験結果を示す。

特許出願人 味の素株式会社

- 55 -

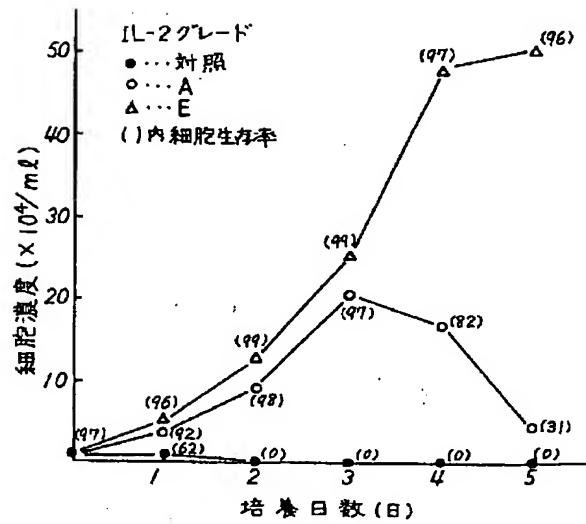


図 / A

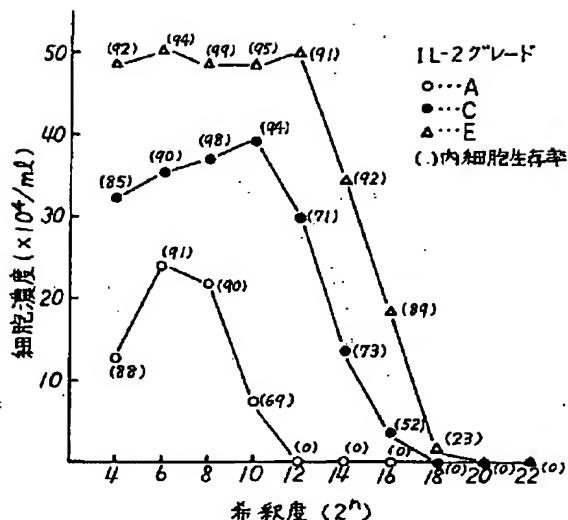


図 / B

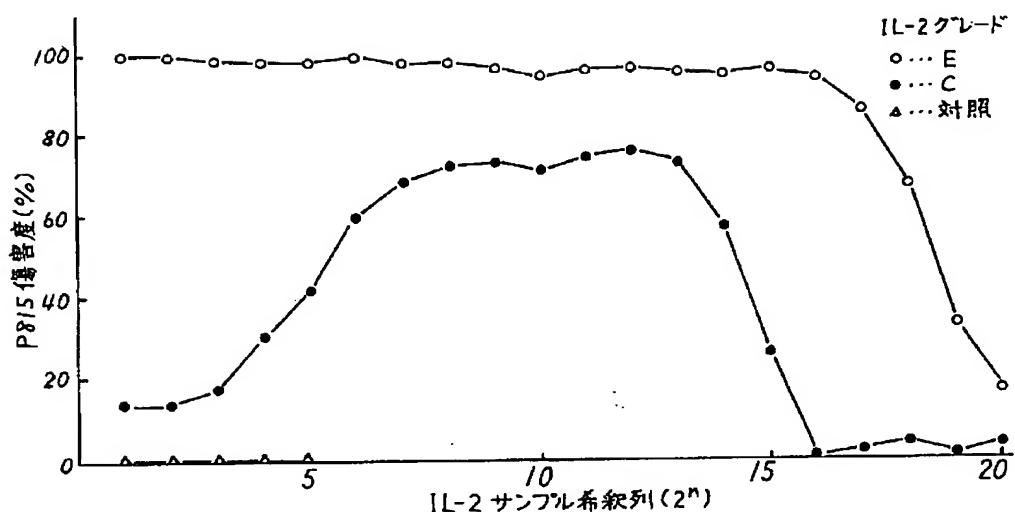


図 2

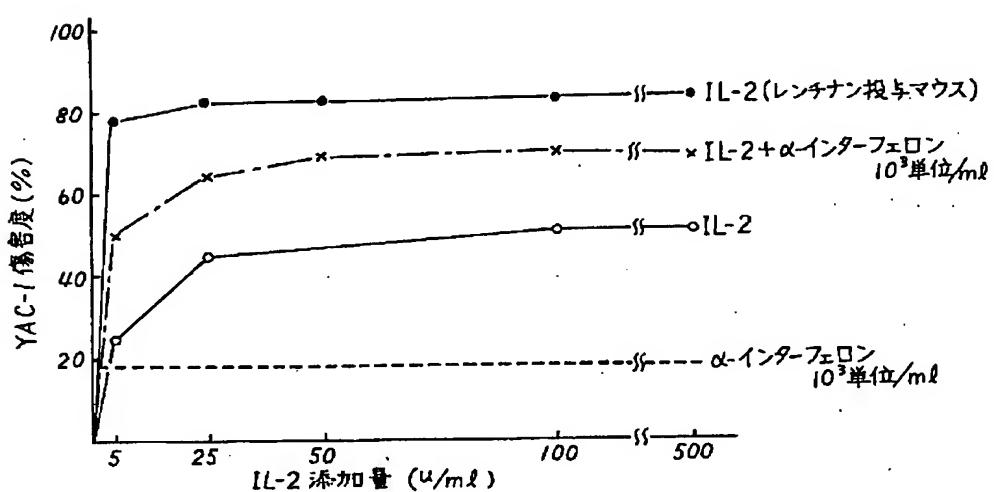


図 3

実験群

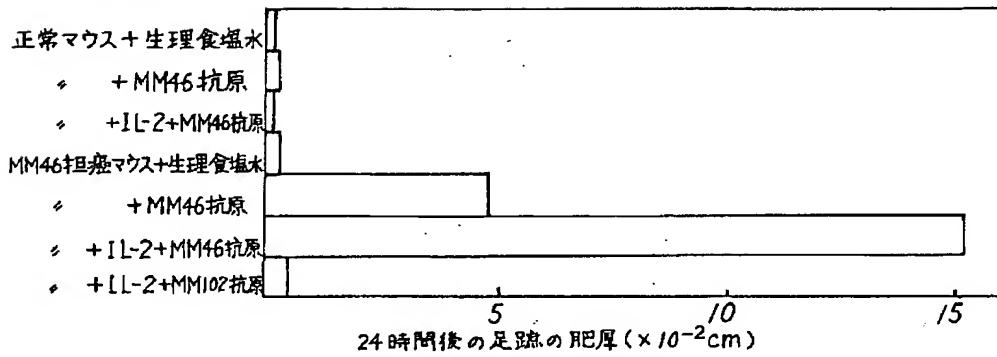


図 4

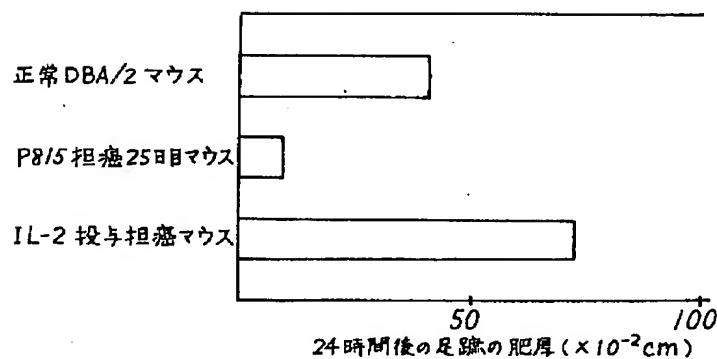
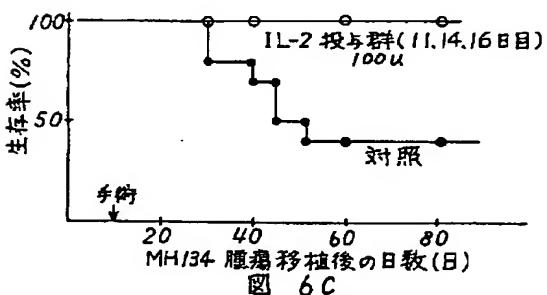
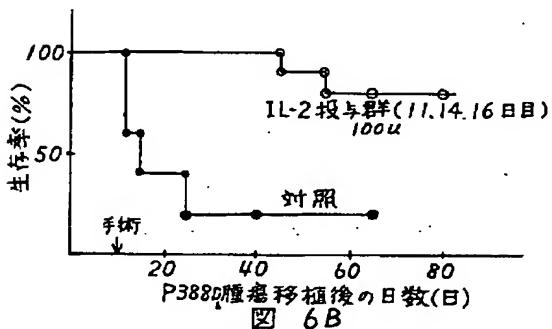
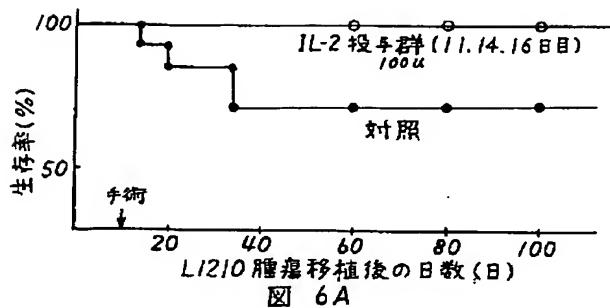


図 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.